

## Cariporide 对高脂血症引起的兔血管内皮功能损伤的保护作用

涂江华, 刘立英, 张小红, 刘桂珍

(中南大学湘雅医学院药理教研室, 湖南长沙 410078)

**[摘要]** 目的:探讨选择性钠氢交换抑制剂 cariporide 对高胆固醇和高脂肪(HCHF)饮食所致的兔动脉粥样硬化血管功能损伤的保护作用。方法:将22只雄性新西兰白兔随机分为3组:正常对照组( $n=6$ )、HCHF饮食组( $n=8$ )、cariporide 治疗组(HCHF饮食+cariporide,  $n=8$ )。在HCHF饲养前和饲养后第10周分别称重,抽血测血清总胆固醇浓度。第10周后处死动物,取胸主动脉检测血管功能。结果:①高脂血症兔胸主动脉对乙酰胆碱(ACh)引起的内皮依赖性舒张(EDR)反应明显降低,cariporide 能明显保护HCHF血症所损伤的EDR反应。②cariporide 对硝普钠所致的非内皮依赖性舒张反应无影响。③cariporide 对HCHF饮食时血清总胆固醇浓度的改变无影响。结论:cariporide 对HCHF血症所致血管内皮功能损伤具有保护作用。提示HCHF饮食所致动脉粥样硬化血管功能损伤可能牵涉细胞膜钠氢交换体的活化。

**[关键词]** 高胆固醇血症; 钠/氢交换体\*; 抑制剂\*; 内皮,血管; 疾病模型,动物; 兔

**[中图分类号]** **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-5625(2002)01-0013-04

### Protective effect of $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ exchanger inhibitor cariporide on the injury of vascular endothelial function induced by hypercholesterolemia

TU Jiang-hua, LIU Li-ying, ZHANG Xiao-hong, et al.

(Department of Pharmacology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410008, China)

**Abstract:** **Objective** To explore possible effects of cariporide, a new  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  exchanger (NHE-1) inhibitor, against injuries of vascular endothelial function induced by hypercholesterolemia. **Methods** Twenty-two healthy New Zealand rabbits were randomly divided into 3 groups: Six were fed with normal diet as the control; eight were fed with high cholesterol plus high fat diet (HCHF) as the injured control group; and the other eight were fed with HCHF plus cariporide orally ( $0.1 \text{ mg/kg} \cdot \text{d}^{-1}$ ) as the treated group. The animals were weighed and their blood was drawn from the central ear artery to analyze plasma cholesterol at the pre-experiment and in the 10th week of postexperiment. The animals were killed in the 10th week and the aortic artery was isolated to analyze vascular endothelial function. **Results** ① The HCHF diet significantly attenuated endothelium-dependent relaxation (EDR) of rabbit aortic rings to acetylcholine (ACh), but cariporide significantly protected against HCHF diet-injured EDR of rabbit aortic rings. The dose-response curves elicited by ACh from HCHF diet rabbits were more significantly shifted to the right than those from HCHF diet plus HOE 642-treated rabbits. ② The HCHF diet and cariporide did not significantly influence the endothelium-independent relaxation of the rabbit artery elicited by sodium nitroprusside (SNP). ③ There was no significant difference in the levels of total cholesterol and LDL-C between the HCHF diet and the HCHF diet plus cariporide rabbits. **Conclusion** The  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  exchanger (NHE-1) inhibitor can protect against injuries of vascular endothelial function induced by hypercholesterolemia. The activated  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  exchangers of cellular membranes may be involved in injuries of vascular endothelial function induced by hypercholesterolemia.

**Key words:** hypercholesterolemia;  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  exchanger\*; inhibitor\*; endothelium, vascular; disease models, animal; rabbits

[Bull Hunan Med Univ, 2002, 27(1):0013-04]

收稿日期:2001-08-01 作者简介:涂江华(1971-),女,湖南常德人,助教,主要从事心血管药理学方面的研究。通讯作者:刘立英。基金资助:国家自然科学基金资助(39770857)

钠氢交换体( $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger, NHE)是真核细胞膜普遍存在的一类转运蛋白,目前已克隆的有6种,心血管以NHE-1为主。NHE-1的主要功能是将细胞内 $\text{H}^+$ 泵出而以1:1电化学方式与细胞外 $\text{Na}^+$ 交换<sup>[1,2]</sup>,其主要生理功能是防止细胞浆的过度酸化以维持细胞内正常的生理pH值和调节细胞内容量<sup>[3]</sup>。许多心血管疾病的病理生理过程与NHE-1的活性密切相关。在病理情况下,某些细胞因子和生长因子可诱导NHE-1的活性增加导致胞浆碱化。如血管平滑肌细胞(SMC)的增生和心肌细胞重构以及肿瘤细胞的增生等都与NHE-1的活化有关<sup>[4]</sup>。

血管内皮细胞(EC)损伤是动脉粥样硬化(AS)发生的始动环节,而血管内皮依赖性舒张(EDR)反应的减弱是AS的一个重要的早期特征<sup>[5]</sup>,在血管壁出现AS斑块之前就可表现出EDR减弱<sup>[6]</sup>。研究发现NHE-1抑制剂对EC功能具有重要调节作用<sup>[7]</sup>。我室以前的工作已证明NHE-1抑制剂cariporide对氧自由基DPPH减弱的血管EDR有明显保护作用<sup>[8,9]</sup>。这些研究结果间接证明NHE-1介导了EC的功能。

大量研究发现选择性NHE-1抑制剂能保护心肌细胞抗缺血再灌注损伤,改善心脏功能和缓解心衰<sup>[10]</sup>。NHE-1对AS的影响研究甚少,本研究通过观察NHE-1抑制剂cariporide对高脂高胆固醇血症引起的血管内皮功能损伤的保护作用,以间接了解NHE-1的活性与AS发生的关系。

## 1 材料与方法

1.1 材料 (1)动物:22只雄性新西兰白兔由中南大学湘雅二医院动物中心提供。(2)试剂:ACH和苯肾上腺素系美国Sigma Chemical公司产品;硝普钠系北京双鹤药业公司产品;cariporide系德国Hoechst公司产品。

### 1.2 方法

1.2.1 动物模型的制备 22只兔随机分为3组:①正常对照组(6只),普通饲料饲养;②高胆固醇高脂(HCHF)组(8只),高胆固醇高脂(HCHF)饲料饲养;③cariporide治疗组(8只),HCHF饲料+cariporide( $0.1\text{ mg/kg}\cdot\text{d}^{-1}$ ,每日于饮水中给予)。HCHF饲料的成分由1%胆固醇、7.5%蛋黄粉、8%猪油及23.5%普通饲料组成。所有动物单笼饲养,饮水不限,共喂养10周。

1.2.2 体重及血清总胆固醇浓度测定 于高脂饮食前及喂养至第5、10周时分别测体重。取血前兔

禁食1晚,次日晨自兔耳中央动脉取血2 ml,用商品药盒(日本产)按药盒说明采用酶标法测血清总胆固醇(CHO)浓度。

1.2.3 血管舒张功能的检测 胸主动脉置于通以95% $\text{O}_2$ +5% $\text{CO}_2$ 混合气体的K-H氏( $\text{NaCl}$  118,  $\text{KCl}$  4.8,  $\text{MgSO}_4$  1.2,  $\text{NaHCO}_3$  24, 葡萄糖 11,及依地酸 $0.03\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )液中。清除血管周围组织,冲洗血管内血液,剪成长4~5 mm血管环,冲洗血管内血液,剪成长4~5 mm血管环,10 mm血管环,冲洗血管内血液,剪成长4~5 mm血管环,用不锈钢钩固定于含K-H液的浴槽,并通过张力换能器将血管收缩与舒张反应记录于二道生理记录仪。静息张力为6 g,平衡120 min后,用苯肾上腺素( $\text{Phe}$ ,  $10^{-7}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )预收缩血管环,达坪值后分别用 $10^{-8.5}$ ~ $10^{-5.5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ACh累加剂量舒张血管环,观察ACh引起的EDR反应。血管环冲洗后平衡15 min,再用苯肾上腺素收缩血管环,达坪值后分别用累加剂量的硝普钠( $\text{SNP}$ ,  $10^{-8}$ ~ $10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )舒张血管,观察SNP引起的非内皮依赖性舒张反应。

1.3 统计学处理 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较用 $t$ 检验,多组间比较用方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ ,  $P<0.05$ 认为有统计学差异。

## 2 结果

2.1 体重 各组动物体重见表1。造模前各组动物体重相似,组间差异无显著性。饲养第10周时各组体重基本接近,差异亦无显著性( $P>0.05$ )。

表1 各组高脂饮食前后兔体重的变化( $\bar{x} \pm s$ , kg)

分组	n	高脂饮食前	高脂饮食后
正常对照组	6	$2.1 \pm 0.07$	$2.9 \pm 0.04$
HCHF组	8	$2.1 \pm 0.05$	$3.0 \pm 0.04$
cariporide治疗组	8	$2.1 \pm 0.04$	$2.9 \pm 0.04$

2.2 血清总胆固醇浓度 以HCHF饲料喂养的两组动物血清总胆固醇(CHO)较正常对照组均显著升高( $P<0.01$ )。cariporide治疗对HCHF饮食致CHO的升高无影响,cariporide治疗组与HCHF组的CHO浓度接近,无明显差异(图1)。

2.3 cariporide对HCHF饮食致EDR降低的保护作用 HCHF饮食使兔胸主动脉EDR明显减弱,cariporide治疗可以保护高脂血症所致的EDR的减弱(图2,表2)。EDR量效曲线显示,cariporide治疗的量效曲线接近正常组,而HCHF组其量效曲线右移(图

2)。ACh( $10^{-5.5}$  mol·L<sup>-1</sup>)引起 EDR 的血管最大舒张度, HCHF 组与正常对照组比较差异有显著性( $P < 0.01$ ), cariporide 治疗组与正常对照组比较差异无显著性( $P > 0.05$ ), 而与 HCHF 组比较差异有显著性( $P < 0.01$ )(表 3)。

2.4 cariporide 对兔胸主动脉环非内皮依赖性血管舒张反应的影响 三组兔胸主动脉环对硝普钠( $10^8 \sim 10^6$  mol·L<sup>-1</sup>)所致的非内皮依赖性血管舒张反应无明显差别(图 3)。

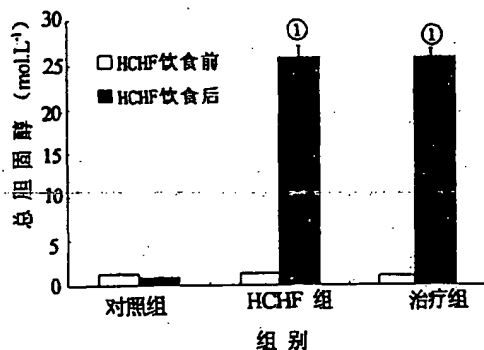


图 1 HCHF 前后各组血清总胆固醇浓度的变化 HCHF 组和 cariporide 治疗组与正常对照组比较, CHO 浓度均显著升高( $P < 0.01$ )

Fig. 1 Comparison of total cholesterol levels in animals of three groups at the pre-experiment and in the 10th week of experiment. There was a significant difference between HCHF group, cariporide group and the control group( $P < 0.01$ )

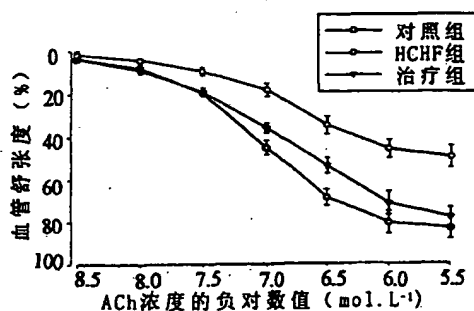


图 2 各组兔胸主动脉对 ACh 引起的舒张反应的量效曲线。

Fig. 2 The curve of dose-response of aortic rings induced by ACh in different diet rabbits.

表 2 三组兔胸主动脉环对 ACh 引起的最大舒张度反应

分组	n	血管最大舒张度(%)
正常对照组	6	83.1 ± 1.5
HCHF 组	8	49.6 ± 1.7 <sup>①</sup>
cariporide 治疗组	8	78.1 ± 4.2 <sup>②</sup>

①与正常对照组比较:  $P < 0.01$ ; ②与 HCHF 组比较:  $P < 0.01$

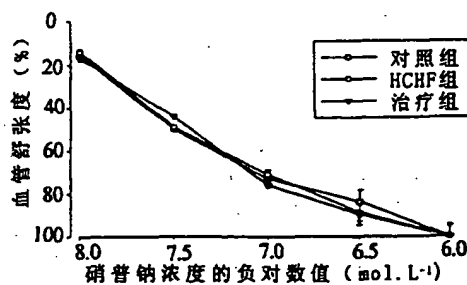


图 3 三组兔胸主动脉对硝普钠引起的非内皮依赖性血管舒张度反应的量效曲线

Fig. 3 Effect of cariporide on relaxations of aortic rings induced by sodium nitroprusside (SNP)

### 3 讨论

本文结果表明兔食 HCHF 饲料 10 周其胸主动脉环对 ACh 引起的 EDR 反应明显减弱, 但对硝普钠引起的非内皮依赖性舒张反应无明显影响。cariporide 能明显保护 HCHF 饮食所损伤的 EDR, 提示 cariporide 对高胆固醇血症减弱的血管 EDR 反应有保护作用。实验表明 HCHF 饮食前和 HCHF 饮食第 10 周各组兔之间体重无明显差别, 故可排除食量差异的影响。

本组资料还显示, cariporide 对 HCHF 所致 EDR 减弱的保护作用不受血清总胆固醇的影响, 说明 cariporide 对 EDR 的保护作用发生在血管组织的局部。AS 形成和发展除了与传统的血脂代谢异常有关外, 还与单核细胞黏附、血管平滑肌细胞的迁移与增生以及炎症和免疫反应等多因素有关<sup>[11]</sup>。ACh 介导的 EDR 是内皮细胞释放 NO 所致<sup>[12]</sup> NO 是由 L-精氨酸在血管内皮细胞内经 NO 合酶作用合成的, 它通过激活平滑肌细胞鸟苷酸环化酶使 cGMP 产生增加, 从而介导平滑肌细胞的舒张<sup>[13]</sup>。NO 对血管有双重性, 一方面 NO 通过扩张血管、抗血小板聚集、抗血管平滑肌细胞增殖等作用保护血管功能; 另一方面因 NO 含有不配对电子, 所以, NO 又是一种自由基, 可在血管内皮细胞产生过氧化硝酸盐自由基而损伤血管<sup>[14]</sup>。对临床病人和动物的研究发现, 在稳定型和不稳定型心绞痛病人的冠状动脉 AS 斑块中, 均含有大量巨噬细胞和 TNF- $\alpha$ , 但只有不稳定心绞痛病人的 AS 斑块中大量表达了诱导型的一氧化氮合酶(inducible isoform of NO synthase, iNOS)。而且 iNOS 的表达与休息时心绞痛的发作及冠状血管形态学的改变相一致<sup>[15]</sup>。用高胆固醇饲料饲养兔 9 周, 高胆固醇血症模型组动物 AS 斑块中表达了 iN-

OS, 而正常组无表达。而且 AS 斑块中的过氧硝酸盐指示剂—硝基酪氨酸(nitrotyrosine)的量与 iNOS 的表达呈正相关<sup>[16]</sup>。

本实验用 HCHF 饲料饲养兔 10 周, 与文献报道的时间相吻合<sup>[15]</sup>。实验显示食 HCHF 饲料 10 周动物胸主动脉的 EDR 明显降低, 而 cariporide 明显保护了 EDR 的降低, 表明 NHE-1 的活化介导了高胆固醇血症所致的血管内皮功能损伤。从病理学检查发现, HCHF 饮食导致主动脉弓形成了 AS 斑块, 内膜下层有大量含脂质的泡沫细胞聚集(另文发表)。笔者未直接测定 AS 斑块中的 iNOS, 但根据文献推测, 本实验观察到的 EDR 变化发生在 AS 形成的中后期。文献报道, 在 AS 的中后期, AS 斑块中的 iNOS 表达增加, iNOS 诱导的 NO 可能与 EC 反应, 形成过氧化物自由基。硝酸盐自由基或其它炎症因子可直接损伤血管内皮细胞<sup>[17]</sup>。

笔者曾发现  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交换抑制剂 HOE694 对 DP-PH 自由基损伤的离体兔血管 EDR 反应有明显保护作用<sup>[8,9]</sup>。cariporide 能明显抑制血清诱导的兔血管平滑肌细胞的增殖<sup>[18]</sup>。笔者发现 cariporide 能抑制单核细胞与内皮细胞的黏附, 抑制 P-选择素和细胞间黏附分子在内皮细胞的表达(另文发表)。因此, cariporide 对高胆固醇血症引起的 EDR 减弱的保护作用可能与 cariporide 抗自由基损伤和抗黏附分子及抗 SMC 增殖有关。但其确切机制有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Theroux P. Myocardial cell protection: A challenging time for action and a challenging time for clinical research[J]. *Circulation*, 2000, 101:2874-2876.
- [2] Frohlich O, Karmazyn M. The Na-H exchanger revisited: An update on Na-H exchange regulation and the role of the exchanger in hypertension and cardiac function in health and disease[J]. *Cardiovasc Res*, 1997, 36:138-148.
- [3] Boron WF, Boulpaep EL. Intracellular pH regulation in the renal proximal tubule of the salamander[J]. *J Gen Physiol*, 1983, 81:29-52.
- [4] Cutsia M, Dawicki DD, Papazian LM, et al. Difference in nucleotide effects on intracellular pH,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport activity, and ATP-binding proteins in endothelial cells[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1997, 33(8): 608-614.
- [5] Simon BC, Cunningham LD, Cohen RA. Oxidized low-density lipoproteins cause contraction and inhibit endothelium-dependent relaxation in the pig coronary artery[J]. *J Clin Invest*, 1990, 86:75-79.
- [6] Osborne JA, Lento PH, Siegfried MR, et al. Cardiovascular effects of acute hypercholesterolemia in rabbits[J]. *J Clin Invest*, 1989, 83:465-73.
- [7] Shimizu S, Paul RJ. Hypoxia and alkalization inhibit endothelium-derived nitric oxide but not endothelium-derived hyperpolarizing factor responses in porcine coronary artery[J]. *J Pharm Exp Thera* 1999, 291:335-344.
- [8] Chen X, Liu LY, Jin ZQ, et al. HOE694 protects isolated heart and aortic endothelium of rabbits against free radical-induced injury[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1996, 28(6):A157-M76.
- [9] 刘立英, 李年生, 蔡朝民, 陈修. HOE694 对外源性自由基所致离体心脏与血管功能损伤的保护作用[J]. *中国药理学通报*, 1997, 13(6).
- [10] Mathur S, Farhangkhoo P, Karmazyn M. Cardioprotective effects of propofol and sevoflurane in ischemic and reperfused rat hearts: role of K(ATP) channels and interaction with the sodium-hydrogen exchange inhibitor HOE642 (cariporide)[J]. *Anesthesiology*, 1999, 91(5): 1349-1360.
- [11] Frohlich J, Dobiasova M, Lear S, et al. The role of risk factors in the development of atherosclerosis[J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2001, 38(5):401-440.
- [12] Bossaller C, Habib Gb, Yamamoto H, et al. Impaired muscarinic endothelium-dependent relaxation and cyclic guanosine 5'-monophosphate formation in atherosclerotic human coronary artery and rabbit aorta[J]. *J Clin Invest*, 1987, 79:170-174.
- [13] Boger RH, Bode-Boger SM, Frolich JC. The L-arginine-nitric oxide pathway: Role in atherosclerosis and therapeutic implications[J]. *Atherosclerosis*, 1996, 127:1-11.
- [14] Dusting GJ, Feennessy P, Yin ZL, et al. Nitric oxide in atherosclerosis: vascular protector or villain[J]? *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl*, 1998, 25:S34-41.
- [15] Depre C, Havaux X, Renkin J, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in human coronary atherosclerotic plaque[J]. *Cardiovasc Res*, 1999, 41(2):465-472.
- [16] Esaki T, Hayashi T, Muto E, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in T lymphocytes and macrophages of cholesterol-fed rabbits[J]. *Atherosclerosis*, 1997, 128(1):39-46.
- [17] Cronheke KM, Kockx MM, De Meyer GR, et al. Inducible nitric oxide synthase colocalizes with signs of lipid oxidation/peroxidation in human atherosclerotic plaques[J]. *Cardiovasc Res*, 1999, 43(3):744-754.
- [18] 涂江华, 刘立英. 选择性钠氢交换抑制剂 HOE642 抑制血管平滑肌细胞增殖[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2001, 15(4):260-264.

(本文编辑 陈丽文)